

明 細 書

生化学反応装置、生化学反応用基板、ハイブリダイゼーション用基板の製造方法及びハイブリダイゼーション方法

技術分野

[0001] 本発明は、基板を用いて生化学反応を行う生化学反応装置、DNAチップ等の生化学反応用基板、ヌクレオチド鎖をハイブリダイゼーションするハイブリダイゼーション方法、並びに、プローブ用のヌクレオチド鎖が固定されたハイブリダイゼーション用の基板製造方法に関する。

本出願は、日本国において2003年7月7日に出願された日本特許出願番号2003-193064を基礎として優先権を主張するものであり、この出願は参照することにより、本出願に援用される。

背景技術

[0002] 現在、マイクロアレイ技術によって所定のDNA(全長又は一部)が微細配列されたいわゆるDNAチップ又はDNAマイクロアレイ(以下、DNAチップと総称する。)と呼ばれる基板が、遺伝子の突然変異、SNPs(一塩基多型)分析、遺伝子発現頻度解析等に利用されており、創薬、臨床診断、薬理ジェノミクス、法医学その他の分野において広範に活用され始めている。

DNAチップを用いたDNA解析手法は、細胞、組織等から抽出したmRNA(messenger RNA)を逆転写PCR(Polymerase Chain Reaction)反応等によって蛍光プローブdNTPを組み込みながらPCR増幅してサンプルDNAを生成し、そのサンプルDNAをDNAチップ上に固相化(固定化)されたプローブDNAに対して滴下して、プローブDNAとサンプルDNAとをハイブリダイゼーションさせる。そして、DNAの2重らせん内に蛍光標識剤を挿入し、所定の検出器でその蛍光測定を行う。このことにより、サンプルDNAとプローブDNAとの塩基配列が同一であるか否かを判別する。

ここで、DNAが負に帯電していることを利用して、固定化されているプローブDNAの近傍にプラス電極を設けることにより、浮遊しているサンプルDNAをプローブDNAの方向に移動させて、ハイブリダイゼーションを高速化させる技術が特開2001-2

38674号公報に開示されている。

しかしながら、一本鎖DNAは、溶液中で直鎖状とはならずランダムコイル状となるので、プローブDNAとサンプルDNAとを結合するには立体障害が大きく、ハイブリダイゼーションを高速に行うことが困難である。浮遊しているサンプルDNAを電界によってプローブDNAの方向に移動させたとしても、その立体障害の度合いは変わらず高速にハイブリダイゼーションを行うことは困難である。

発明の開示

発明が解決しようとする課題

[0003] 本発明の目的は、このような従来の課題を解決するため、ハイブリダイゼーションを高速に行うことができる生化学反応装置を提供することにある。

本発明の他の目的は、ハイブリダイゼーションを高速に行うとともに構造が簡易な生化学反应用基板を提供することにある。

本発明のさらに他の目的は、ハイブリダイゼーションを高速に行うとともに構造が簡易なハイブリダイゼーション用基板を製造する基板製造方法を提供することにある。

本発明のさらに他の目的は、高速で容易にハイブリダイゼーションを行うことができるハイブリダイゼーション方法を提供することにある。

本発明は、基板を用いて生化学反応を行う生化学反応装置であって、生化学反応を行う反応領域と、反応領域に形成された電極を有する基板を保持する保持手段と、基板の上記電極に対向するように配設された外部電極と、基板の電極と外部電極との間に電界を発生させる電界制御手段とを備える。

本発明に係る生化学反应用基板は、生化学反応に用いられる基板である生化学反应用基板であって、生化学反応を行う反応領域と、反応領域内に電界が形成されるように、外部電極との間に電界を発生させる電極とを備えている。

本発明は、ハイブリダイゼーション用基板の製造方法であって、平板状の基板表面に対して底面が第1の官能基で修飾された複数のウェルを形成し、第1の官能基と結合する第2の官能基により一端が修飾されたヌクレオチド鎖を含む溶液を各ウェル内に滴下し、平板状の基板に対して垂直方向の交流電界を印加しながら第1の官能基と第2の官能基とを結合させ、ヌクレオチド鎖をウェルの底面に結合させる。

この基板製造方法では、プローブ用のヌクレオチド鎖を表面に対して垂直方向の交流電界を与えて垂直方向に伸張及び移動させながら、一端を平板状の基板の表面に接続する。

本発明に係るハイブリダイゼーション方法は、平板状の基板の表面に形成されておりプローブ用のヌクレオチド鎖の一端が底面に結合されたウェルの内部に対して、サンプル用のヌクレオチド鎖を含む溶液を滴下し、平板状の基板に対して垂直方向に交流電界を印加しながら、プローブ用のヌクレオチド鎖とサンプル用のヌクレオチド鎖とをハイブリダイゼーションする。

このハイブリダイゼーション方法では、一端を平板状の基板の表面に接続してプローブ用のヌクレオチド鎖をウェル内に固定化し、平板状の基板の表面に対して垂直方向の交流電界を与えてウェル内のヌクレオチド鎖を垂直方向に伸張及び移動させる。

本発明の更に他の目的、本発明によって得られる具体的な利点は、以下において図面を参照して説明される実施の形態の説明から一層明らかにされるであろう。

図面の簡単な説明

[0004] [図1]図1は、本発明に係るバイオアッセイ用基板の平面図である。

[図2]図2は、本発明に係るバイオアッセイ用基板の断面図である。

[図3]図3は、バイオアッセイ用基板のウェルを形成する工程を示した図である。

[図4]図4は、ウェルの底面に修飾されるOH基を有するシラン分子を示す図である。

[図5]図5は、ウェルの底面に結合したプローブDNAを示す図である。

[図6]図6は、バイオアッセイ用基板に対して溶液の滴下制御を説明するための図である。

[図7]図7は、バイオアッセイ用基板に対して交流電界の印加の方法を説明するための図である。

[図8]図8は、本発明に係るバイオアッセイ用基板を用いてDNA解析を行うDNA解析装置を示すブロック部である。

発明を実施するための最良の形態

[0005] 以下、本発明を適用した具体的な実施の形態として、本発明を適用したDNA解析

用のバイオアッセイ用基板及びこのバイオアッセイ用基板を用いてDNA解析を行うバイオアッセイ方法について説明をする。

図1に本発明の実施の形態のバイオアッセイ用基板1の上面を模式的に表した図を示し、図2に本発明の実施の形態のバイオアッセイ用基板1の断面を模式的に表した図を示す。

バイオアッセイ用基板1の全体形状は、例えばCD (Compact Disk)、DVD (Digital Versatile Disk) 等の光ディスクと同様に、主面が円形とされた平板状となっている。バイオアッセイ用基板1の主面の中心には、中心孔2が形成されている。中心孔2には、当該バイオアッセイ用基板1がDNA解析装置に装着されたときに、当該バイオアッセイ用基板1を保持及び回転させるためのチャッキング機構が挿入される。

バイオアッセイ用基板1は、図2に示すように、下層側から、基板層3と、透明電極層4と、固相化層5と、ウェル形成層6とから形成されている。なお、バイオアッセイ用基板1のウェル形成層6側の表面を上面1a、基板層3側の表面を下面1bというものとする。

基板層3は、詳細を後述する蛍光標識剤を励起する励起光及び蛍光標識剤の蛍光を透過する材料である。例えば、基板層3は、石英ガラス、シリコン、ポリカーボネート、ポリスチレン等の材料で形成されている。

透明電極層4は、基板層3上に形成された層である。透明電極層4は、例えばITO (インジウム-スズ-オキシド) やアルミニウム等の光透過性がありかつ導電性を有する材料から形成されている。透明電極層4は、基板層3上に例えばスパッタリングや電子ビーム蒸着等により250nm程度の厚さに成膜される形成される。

固相化層5は、透明電極層4上に形成された層である。固相化層5は、プローブDNAの一端を固相化させるための材料から形成されている。本例では、固相化層5は、シランにより表面修飾可能な SiO_2 が例えばスパッタリングや電子ビーム蒸着により50nm程度の厚さに成膜された層とされている。

ウェル形成層6は、固相化層5上に形成された層である。ウェル形成層6は、複数のウェル8が形成された層である。

ウェルは、その内部空間が、プローブDNA (検出用ヌクレオチド鎖) とサンプルDN

A(標的ヌクレオチド鎖)との相互反応の場合、具体的には、ハイブリダイゼーション反応の場合となる。ウェル8は、バイオアッセイ用基板1の上面1a側に開口したくぼみ状となっており、サンプルDNAが含まれた溶液等の液体が滴下されたときにその液体を保留することができる程度の深さ及び大きさとなっている。例えば、ウェル8は、開口部が100 μ m四方の大きさに形成され、深さが5 μ m程度とされて、底面11に固相化層5が露出している。

このようなウェル形成層6は、図3の(a)に示すように、固相化層5の上に感光性ポリミド13をスピンコート等で5 μ m程度の厚さに塗布する(ステップS1)。続いて、図3の(b)に示すように、塗布した感光性ポリミド13上に所定のパターンのフォトマスク14を形成し、このフォトマスク14を用いて感光性ポリミド13露光及び現像する(ステップS2)。このことにより、図3の(c)に示すように、ウェル形成層6に複数のウェル8が形成される(ステップS3)。

さらに、ウェル8は、一端が官能基により修飾されたプローブDNAが底面11(固相化層5が露出した部分)に結合するように、当該底面11が官能基により表面修飾されている。例えば、ウェル8は、図4に示すように、SH基15を有するシラン分子16により、底面11(SiO_2 から形成されている固相化層5)が表面修飾されている。このため、ウェル8の底面11には、例えばSH基で一端が修飾されたプローブDNAを結合させることができる。このようにバイオアッセイ用基板1では、ウェル8の底面11に、プローブDNAの一端を結合させることができるので、図5に示すように、底面11から垂直方向に鎖が伸びるように、プローブDNA(P)を結合させることができる。

また、バイオアッセイ用基板1では、図1に示すように、複数のウェル8が、主面の中心から外周方向に放射状に向かう複数の列上に、例えば400 μ m程度の間隔で等間隔に並んで配置されている。

また、バイオアッセイ用基板1には、バイオアッセイ用基板1の下面1b側からレーザー光を照射することにより読み取り可能なアドレスピット9が形成されている。アドレスピット9は、バイオアッセイ用基板1の平面上における各ウェル8の位置を特定するための情報である。アドレスピット9から情報を光学的に読み取ることによって、複数存在するウェル8のうち、現在レーザー光を照射している位置の1つのウェル8がどれであるか

を特定することが可能となる。このようなアドレスピット9が設けてあることによって、後述する滴下装置による溶液の滴下位置の制御や、対物レンズによる蛍光検出位置の特定を行うことができる。

以上のようなバイオアッセイ用基板1では、円板状に形成されているため、光ディスクシステムと同様の再生システムを利用することにより、レーザ光のフォーカシング位置を制御するためのフォーカシングサーボ制御、半径方向に対するレーザ光の照射位置や滴下装置による滴下位置の制御のための位置決めサーボ制御、並びに、アドレスピット9の情報検出処理をすることができる。つまり、アドレスピット9に記録してある情報内容と、そのアドレスピット9の近傍にあるウェル8とを対応させておくことにより、アドレスピット9の情報を読み出すことで、特定の1つのウェル8に対してのみレーザ光を照射して蛍光が発光しているウェル8の位置を特定したり、特定の1つのウェル8の位置と滴下装置との相対位置を制御して、その特定の1つのウェル8に対して溶液を滴下したりすることができる。

さらに、以上のようなバイオアッセイ用基板1では、ウェル8の上部側から電極を近接させれば当該電極と透明導電層4との間に平行電界を形成させることができる。そのため、例えば、DNAのハイブリダイゼーションを行う場合には、ウェル8に対して交流電界を与えることによって、ウェル内に浮遊するDNAを伸張させてハイブリダイゼーションの進行を促進させることができる。

次に、以上のようなバイオアッセイ用基板1を用いたDNA解析方法について説明をする。

まず、一端がSH基で修飾されたプローブDNAが含有した溶液Sを所定のウェル8に対して滴下する。このとき、1つのバイオアッセイ用基板1に対して、複数種類のプローブDNAが滴下する。ただし、1つのウェル8内には1種類のプローブDNAが入るようにする。なお、各ウェル8にいずれの種類のプローブDNAを滴下するかは、予めウェルとプローブDNAとの対応関係を示す配置マップ等を生成しておき、その配置マップに基づき滴下制御する。

また、溶液Sの滴下制御は、光ディスクの駆動システムと同様にバイオアッセイ用基板1を駆動制御することにより行う。すなわち、図6に示すように、バイオアッセイ用基

板1を上面1aを上にして平行に保持しながら回転駆動するとともに、レーザ光Vをバイオアッセイ用基板1の下側(下面1b側)から照射してアドレスピット9を検出することによりウェル8の位置を特定しながら、滴下位置の制御を行えばよい。

続いて、図7に示すように、バイオアッセイ用基板1の上面1a側の外部から、ウェル8の開口部の大きさよりも充分大きい平坦面18a(例えば直径が300 μ mの円状の面)が先端部に形成された探針状の外部電極18を、所定のウェル8に対して上記先端部が覆いかぶるように近接する。続いて、この外部電極18と透明電極層4との間に交流電圧を印加して、バイオアッセイ用基板1の主面に対して垂直方向の交流電界を印加する。例えば、ウェル8内に、1MV/m、1MHz程度の交流電界を印加する。

このように交流電界を所定のウェル8に印加すると、ウェル8内の溶液中に浮遊しているプローブDNA(P)がバイオアッセイ用基板1の主面に対して垂直方向に伸張するとともに、そのプローブDNAがバイオアッセイ用基板1に垂直方向に移動する。このため、予め表面修飾処理がされた底面11に、そのプローブDNAの修飾端が結合し、ウェル8の底面11にプローブDNAを固相化(固定化)することができる。

バイオアッセイ用基板1の主面に対して垂直な平行電界を印加するためには、外部電極18の先端部に平坦面18aが形成され、その平坦面が透明電極層4と平行であることが望ましい。また、この平坦性を確保するために先端部分にアクセプタ又はドナーイオンを高ドーピングしたSiやGaAs等の鏡面研磨された半導体ウェハを、探針状の金属の先端部分に取り付けてもよい。半導体ウェハを取り付ける場合には、探針状の金属と半導体ウェハとのショットキーバリアを小さくするとともにオーミックコンタクトを得るために、チタンや金等の材料を介して半導体ウェハを接続するのが望ましい。

交流電界を印加すると一本鎖DNA(ヌクレオチド鎖)が伸張及び移動する理由は、次のとおりである。すなわち、ヌクレオチド鎖内では、ヌクレオチド鎖の骨格をなすリン酸イオン(陰電荷)とその周辺にある水がイオン化した水素イオン(陽電荷)とによってイオン雲が形成されていると考えられ、これらの陰電荷及び陽電荷により生じる分極ベクトルが、高周波高電圧の印加により全体として一方向を向き、その結果としてヌクレオチド鎖が伸長するためである。さらに、電気力線が一部に集中する不均一電界が印加された場合、ヌクレオチド鎖は、電気力線が集中する部位に向かって移動も

する (Seiichi Suzuki, Takeshi Yamanashi, Shin-ichi Tazawa, Osamu Kurosawa and Masao Washizu: "Quantitative analysis on electrostatic orientation of DNA in stationary AC electric field using fluorescence anisotropy", IEEE Transaction on Industrial Application, Vol.34, No.1, p.75-83 (1998)参照)。

このように、交流電界を印加すると、プローブDNAがその電界に平行な方向に伸張して立体障害の少ない状態となり、プローブDNAと底面11とが結合しやすい状態となる。そして、プローブDNAと底面11とが結合することにより、ウェル8の底面11にプローブDNAを固相化(固定化)することができる。

続いて、生体から抽出したサンプルDNAが含有した溶液をバイオアッセイ用基板1上の各ウェル8に滴下する。

続いて、サンプルDNAの滴下後、バイオアッセイ用基板1の上面1a側の外部から、上記外部電極18を所定のウェル8に対して覆いかぶせるように近接する。続いて、温度を60度C程度に維持しながら、外部電極18と透明電極層4との間に交流電圧を印加する。すなわち、加熱しながらバイオアッセイ用基板1の主面に対して垂直方向の交流電界を印加する。例えば、ウェル8内に1MV/m、1MHz程度の交流電界を印加する。

このような処理をすると、サンプルDNAとプローブDNAとが垂直方向に伸張して立体障害の少ない状態となるとともに、サンプルDNAがバイオアッセイ用基板1に対して垂直方向に移動する。この結果、互いの塩基配列が相補的な関係にあるサンプルDNAとプローブDNAとが同一のウェル8内にある場合には、それらがハイブリダイゼーションを起こす。

続いて、ハイブリダイゼーションを起こさせた後に、蛍光標識インタカレータ等をバイオアッセイ用基板1のウェル8内に滴下する。このような蛍光標識剤は、ハイブリダイゼーションを起こしたプローブDNAとサンプルDNAとの二重らせん間に挿入して結合する。

続いて、バイオアッセイ用基板1の表面1aを純水等で洗浄し、ハイブリダイゼーションを起こしていないウェル8内のサンプルDNA及び蛍光標識剤を除去する。この結果、ハイブリダイゼーションを起こしたウェル8内にのみ、蛍光標識剤が残存することと

なる。

続いて、光ディスクの駆動システムと同様にバイオアッセイ用基板1を駆動制御することにより、ウェル8からの蛍光の検出を行う。すなわち、バイオアッセイ用基板1を保持しながら回転駆動するとともに、レーザ光Vをバイオアッセイ用基板1の下側(下面1b側)から照射してアドレスピット9を検出することによりウェル8の位置を特定する。それと同時に、励起光をバイオアッセイ用基板1の下側(下面1b側)から照射して、その励起光に応じて生じる蛍光をやはり下面1b側から検出する。そして、どのウェル8から蛍光が発生されているか否かを検出する。

続いて、バイオアッセイ用基板1上の蛍光が発生していたウェル8の位置を示すマップ作成する。そして、その作成したマップ、並びに、各ウェル8にどのような塩基配列のプローブDNAが滴下されていたかを示す配置マップに基づき、サンプルDNAの塩基配列の解析を行う。

以上のようにバイオアッセイ用基板1を用いたDNA解析方法では、溶液中に浮遊したプローブDNAを基板1の表面に対して垂直方向の交流電界を与えて垂直方向に伸張及び移動させながら、一端をウェル8の底面11に接続する。したがって、バイオアッセイ用基板1に対して垂直に電界を与えるので、例えば、基板上に電極をパターンニングして生成しなくてもよい、非常に簡易的な層構造の電極を用いて、プローブDNAを固定することができる。

また、以上のようにバイオアッセイ用基板1を用いたDNA解析方法では、溶液中に浮遊したサンプルDNA及び一端がウェル8の底面に固定されたプローブDNAに対して、垂直方向の交流電界を与えて垂直方向に伸張及び移動させる。したがって、サンプルDNA及びプローブDNAがともに同方向に伸張及び移動するので、ハイブリダイゼーションが促進する。さらに、このような電界を与えるための電極を基板上に電極をパターンニングして生成しなくてもよい、非常に簡易的な層構造の電極を用いて、プローブDNAを固定することができる。

なお、本実施の形態では、外部電極18の形状を探針状として少数のウェル8に対してのみ交流電界を与える例を示したが、外部電極18はこのようなものに限られず、ウェル8に対して垂直方向の交流電界を与えられればどのような形状であってもよい。

。例えば、バイオアッセイ用基板1の主面とほぼ同一の大きさの円板状の電極を用いて、全ウェル8に対して同時に交流電界を印加するようにしてもよい。また、本実施の形態では、バイオアッセイ用基板1内に透明電極層4を設けているが、透明電極層4を設けずに、下面1b側の外部から外部電極18と同様の電極を近接させてウェル8に対して垂直方向の電界を与えてもよい。

次に、本発明に係るバイオアッセイ基板1を用いてDNA解析を行うDNA解析装置51について、図8を参照して説明をする。

DNA解析装置51は、図8に示すように、上述した外部電極18と、バイオアッセイ用基板1を保持して回転をさせるディスク装填部52と、ハイブリダイゼーションのための各種溶液を貯留するとともにバイオアッセイ用基板1のウェル8にその溶液を滴下する滴下部53と、バイオアッセイ用基板1から励起光を検出するための励起光検出部54と、上記の各部の管理及び制御を行う制御部55とを備えている。

ディスク装填部52は、バイオアッセイ用基板1の中心孔2内に挿入して当該バイオアッセイ用基板1を保持するチャッキング機構61と、チャッキング機構61を駆動することによりバイオアッセイ用基板1を回転させるスピンドルモータ62と有している。ディスク装填部52は、上面1a側が上方向となるようにバイオアッセイ用基板1を水平に保持した状態で、当該バイオアッセイ用基板1を回転駆動する。ディスク装填部52では、バイオアッセイ用基板1を水平に保持することによって、ウェル8に滴下された溶液が垂れてしまうといった問題を回避することができる。

滴下部53は、試料溶液Sや蛍光標識剤S'を貯留する貯留部63と、貯留部63内の試料溶液Sや蛍光標識剤S'をバイオアッセイ用基板1に滴下する滴下ヘッド64とを有している。滴下ヘッド64は、水平に装填されたバイオアッセイ用基板1の上面1aの上方に配置されている。さらに、滴下ヘッド64は、バイオアッセイ用基板1のアドレスピットから読み出される位置情報及び回転同期情報に基づいてバイオアッセイ用基板1との相対位置を半径方向に制御し、サンプルDNA(標的ヌクレオチド鎖T)を含有する試料溶液Sを所定のウェル8の反応領域8に正確に追従して滴下する構成とされている。また、貯留部63は、貯留部63と滴下ヘッド64との組み合わせは、ハイブリダイゼーションのために使用する試料溶液の数だけある。

また、滴下部53では、バイオアッセイ用基板1上の所定の位置に正確に試料溶液Sを滴下するために、例えば、いわゆる「インクジェットプリンティング法」に基づく滴下方法が採用されている。「インクジェットプリンティング法」は、滴下ヘッド64にいわゆるインクジェットプリンタで用いられるインク噴出機構を適用する方法であり、インクジェットプリンタのようなノズルヘッドからバイオアッセイ用基板1に試料溶液Sを噴射するものである。

励起光検出部54は、光学ヘッド70を有している。光学ヘッド70は、水平に装填されたバイオアッセイ用基板1の下方側、すなわち、下面1b側に配置されている。光学ヘッド70は、例えば、図示していないスレッド機構等により、バイオアッセイ用基板1の半径方向に移動自在とされている。

光学ヘッド70は、対物レンズ71と、対物レンズ71を移動可能に支持する2軸アクチュエータ72と、導光ミラー73とを有している。対物レンズ71は、その中心軸がバイオアッセイ用基板1の表面に対して略垂直となるように2軸アクチュエータ72に支持されている。したがって、対物レンズ71は、バイオアッセイ用基板1の下方側から入射された光束を当該バイオアッセイ用基板1に対して集光することができる。2軸アクチュエータ72は、バイオアッセイ用基板1の表面に対して垂直な方向、及び、バイオアッセイ用基板1の半径方向の2方向に対物レンズ71を移動可能に支持している。2軸アクチュエータ72を駆動することにより、対物レンズ71により集光された光の焦点を、バイオアッセイ用基板1の表面に対して垂直な方向及び半径方向に移動させることができる。したがって、この光学ヘッド70では、光ディスクシステムにおけるジャストフォーカス制御並びに位置決め制御と同様の制御を行うことができる。

導光ミラー73は、光路X上に対して45°の角度で配置されている。光路Xは、励起光P、蛍光F、サーボ光V及び反射光Rが、光学ヘッド70に対して入射及び出射する光路である。導光ミラー73には、励起光P及びサーボ光Vが光路X上から入射される。導光ミラー73は、励起光P及びサーボ光Vを反射して90°屈折させて、対物レンズ71に入射する。対物レンズ71に入射された励起光P及びサーボ光Vは、当該対物レンズ71により集光されてバイオアッセイ用基板1に照射される。また、導光ミラー73には、蛍光F及びサーボ光Vの反射光Rが、バイオアッセイ用基板1から対物レンズ71

を介して入射される。導光ミラー73は、蛍光F及び反射光Rを反射して90° 屈折させて、光路X上に出射する。

なお、光学ヘッド70をスレッド移動させる駆動信号及び2軸アクチュエータ72を駆動する駆動信号は、制御部55から与えられる。

また、励起光検出部54は、励起光Pを出射する励起光源74と、励起光源74から出射された励起光Pを平行光束とするコリメータレンズ75と、コリメータレンズ75により平行光束とされた励起光Pを光路X上で屈折させて導光ミラー73に照射する第1のダイクロックミラー76とを有している。

励起光源74は、蛍光標識剤を励起可能な波長のレーザ光源を有する発光手段である。励起光源74から出射される励起光Pは、ここでは波長が405nmのレーザ光である。なお、励起光Pの波長は、蛍光標識剤を励起できる波長であればどのような波長であつてもよい。コリメータレンズ75は、励起光源74から出射された励起光Pを平行光束にする。第1のダイクロックミラー76は、波長選択性を有する反射鏡であり、励起光Pの波長の光のみを反射して、蛍光F及びサーボ光V(その反射光R)の波長の光を透過する。第1のダイクロックミラー76は、光路X上に45° の角度を持って挿入されており、コリメータレンズ75から出射された励起光Pを反射して90° 屈折させ、導光ミラー73に励起光Pを照射している。

また、励起光検出部54は、蛍光Fを検出するアバランジェフオトダイオード77と、蛍光Fを集光する集光レンズ78と、光学ヘッド70から光路X上に出射された蛍光Fを屈折させてアバランジェフオトダイオード77に照射する第2のダイクロックミラー79とを有している。

アバランジェフオトダイオード77は、非常に感度の高い光検出器であり、微弱な光量の蛍光Fを検出することが可能である。なお、アバランジェフオトダイオード77により検出する蛍光Fの波長は、ここでは470nm程度である。また、この蛍光Fの波長は、蛍光標識剤の種類により異なるものである。集光レンズ78は、アバランジェフオトダイオード77上に蛍光Fを集光するためのレンズである。第2のダイクロックミラー79は、光路X上に45° の角度を挿入されているとともに、導光ミラー73側から見て第1のダイクロックミラー76の後段に配置されている。したがって、第2のダイクロックミラー79

には、蛍光F、サーボ光V及び反射光Rが入射し、励起光Pは入射しない。第2のダイクロックミラー79は、波長選択性を有する反射鏡であり、蛍光Fの波長の光のみを反射して、サーボ光(反射光R)の波長の光を透過する。第2のダイクロックミラー79は、光学ヘッド70の導光ミラー73から出射された蛍光Fを反射して90°屈折させ、集光レンズ78を介してアバランジェフォトダイオード77に蛍光Fを照射する。

アバランジェフォトダイオード77では、このように検出した蛍光Fの光量に応じた電気信号を発生し、その電気信号を制御部55に供給する。

また、励起光検出部54は、サーボ光Vを出射するサーボ光源80と、サーボ光源80から出射されたサーボ光Vを平行光束とするコリメータレンズ81と、サーボ光Vの反射光Rを検出するフォトディテクト回路82と、非点収差を生じさせてフォトディテクト回路82に対して反射光Rを集光するシリンдриカルレンズ83と、サーボ光Vと反射光Rとを分離する光セパレータ84とを有している。

サーボ光源80は、例えば780nmの波長のレーザ光を出射するレーザ光源を有する発光手段である。なお、サーボ光Vの波長は、アドレスピットが検出できる程度の波長であり、励起光P及び蛍光Fの波長と異なっていれば780nmに限らずどのような波長であってもよい。コリメータレンズ81は、サーボ光源80から出射されたサーボ光Vを平行光束にする。平行光束とされたサーボ光Vは光セパレータ84に入射される。

フォトディテクト回路82は、反射光Rを検出するディテクタと、検出した反射光Rからフォーカスエラー信号、位置決めエラー信号、及びアドレスピットの再生信号を生成する信号生成回路とを有している。反射光Rは、サーボ光Vがバイオアッセイ用基板1で反射して生成された光であるので、その波長は、サーボ光と同一の780nmである。

なお、フォーカスエラー信号は、対物レンズ71により集光された光の合焦位置と、バイオアッセイ用基板1の基板層3との位置ずれ量を示すエラー信号である。フォーカスエラー信号が0となったときに、対物レンズ71とバイオアッセイ用基板1との間の距離が最適になる。位置決めエラー信号は、所定のウェル8の位置と、焦点位置とのディスク半径方向に対する位置ずれ量を示す信号である。位置決めエラー信号が0となったときに、サーボ光Vのディスク半径方向に対する照射位置が任意のウェル8

に一致したこととなる。アドレスピットの再生信号は、バイオアッセイ用基板1に記録されているアドレスピットに記述されている情報内容を示す信号である。この情報内容を読み出すことにより、現在サーボ光Vを照射しているウェル8を特定することができる。

フォトディテクト回路82は、反射光Rに基づき生成されたフォーカスエラー信号、位置決めエラー信号及びアドレスピットの再生信号を制御部55に供給する。

シリンドリカルレンズ83は、フォトディテクト回路82上に反射光Rを集光するとともに非点収差を生じさせるためのレンズである。このように非点収差を生じさせることによりフォトディテクト回路82によりフォーカスエラー信号を生成させることができる。

光セパレータ84は、偏向ビームスプリッタからなる光分離面84aと1/4波長板84bにより構成されている。光セパレータ84では、1/4波長板84bの逆側から入射された光を光分離面84aが透過し、その透過光の反射光が1/4波長板84b側から入射された場合には光分離面84aが反射する機能を有している。光セパレータ84は、光分離面84aが光路X上に45°の角度を挿入されているとともに、導光ミラー73側から見て第2のダイクロックミラー79の後段に配置されている。したがって、光セパレータ84では、コリメータレンズ81から出射されたサーボ光Vを透過して光学ヘッド70内の導光ミラー73に対してそのサーボ光Vを入射させているとともに、光学ヘッド70の導光ミラー73から出射された反射光Rを反射することにより90°屈折され、シリンドリカルレンズ83介してフォトディテクト回路82に反射光Rを照射する。

制御部55は、励起光検出部54により検出されたフォーカスエラー信号、位置決めエラー信号及びアドレスピットの再生信号に基づき、各種のサーボ制御を行う。

すなわち、制御部55は、フォーカスエラー信号に基づき光学ヘッド70内の2軸アクチュエータ72を駆動して対物レンズ71とバイオアッセイ用基板1との間の間隔を制御し、フォーカスエラー信号が0となるようにサーボ制御を行う。また、制御/サーボ部55は、位置決めエラー信号に基づき光学ヘッド70内の2軸アクチュエータ72を駆動して対物レンズ71をバイオアッセイ用基板1の半径方向に移動制御し、フォーカスエラー信号が0となるようにサーボ制御を行う。また、制御部55は、アドレスピットの再生信号に基づき光学ヘッド70のスレッド移動制御を行って光学ヘッド70を所定の半径位

置に移動し、目的のウェル位置に対物レンズ71を移動させる。

また、制御部55は、ハイブリダイゼーション時に、交流電力発生部31を制御し、電力の供給の制御も行う。

以上のような構成のDNA解析装置51では、次のような動作を行う。

DNA解析装置51は、バイオアッセイ用基板1を回転させながら、ウェル8上にサンプルDNAが含有した溶液を滴下し、プローブDNAとサンプルDNAとを相互反応（ハイブリダイゼーション）させる。ハイブリダイゼーション時には上述した電界の制御も行う。また、ハイブリダイゼーション処理の済んだバイオアッセイ用基板1上に、蛍光標識剤を含んだバッファ溶液を滴下する。

また、DNA解析装置51は、蛍光標識剤が滴下された後のバイオアッセイ用基板1を回転させ、励起光Pを当該バイオアッセイ用基板1の下面1b側から入射させてウェル8内の蛍光標識剤に照射し、その励起光Pに応じてその蛍光標識剤から発生した蛍光Fをバイオアッセイ用基板1の下方から検出する。

ここで、DNA解析装置51では、励起光Pとサーボ光Vとを同一の対物レンズ71を介してバイオアッセイ用基板1に照射している。そのため、DNA解析装置51では、サーボ光Vを用いたフォーカス制御、位置決め制御並びにアドレス制御を行うことによって、励起光Pの照射位置、すなわち、蛍光Fの発光位置を特定することが可能となり、その蛍光の発光位置からサンプルDNAと結合したプローブDNAを特定することができる。

なお、本発明は、図面を参照して説明した上述の実施例に限定されるものではなく、添付の請求の範囲及びその主旨を逸脱することなく、様々な変更、置換又はその同等のものを行うことができることは当業者にとって明らかである。

産業上の利用可能性

[0006] 本発明に係る生化学反応装置では、生化学反応を行う反応領域と、反応領域に形成された電極を有する基板に対して、電極を近接させて上記反応領域に平行電界を形成させる。そのため、例えば、ヌクレオチド鎖のハイブリダイゼーションを行う場合には、ウェルに対して交流電界を与えることによって、ウェル内に浮遊するヌクレオチド鎖を伸張させてハイブリダイゼーションの進行を促進させることができる。

本発明に係る生化学反応用基板では、反応領域内に電界が形成されるように、外部電極との間に電界を発生させる電極とを備えている。したがって、この生化学反応用基板では、反応領域に電極を近接させれば反応領域に平行電界を形成させることができる。そのため、例えば、ヌクレオチド鎖のハイブリダイゼーションを行う場合には、ウェルに対して交流電界を与えることによって、ウェル内に浮遊するヌクレオチド鎖を伸張させてハイブリダイゼーションの進行を促進させることができる。

本発明に係る基板製造方法では、プローブ用のヌクレオチド鎖を表面に対して垂直方向の交流電界を与えて垂直方向に伸張及び移動させながら、一端を平板状の基板の表面に接続する。したがって、この基板製造方法では、平板状の基板に対して垂直に電界を与えるので、非常に簡易的な構成の電極を用いて、高速にプローブ用のヌクレオチド鎖を基板に固定することができる。

本発明に係るハイブリダイゼーション方法では、一端を平板状の基板の表面に接続してプローブ用のヌクレオチド鎖をウェル内に固定化し、平板状の基板の表面に対して垂直方向の交流電界を与えてウェル内のヌクレオチド鎖を垂直方向に伸張及び移動させる。したがって、このハイブリダイゼーション方法では、平板状の基板に対して垂直に電界を与えるので、非常に簡易的な構成の電極を用いて、高速にハイブリダイゼーションを行うことが可能となる。

請求の範囲

- [1] 1. 基板を用いて生化学反応を行う生化学反応装置において、
上記生化学反応を行う反応領域と、上記反応領域に形成された電極を有する基板を保持する保持手段と、
上記基板の上記電極に対向するように配設された外部電極と、
上記基板の上記電極と上記外部電極との間に電界を発生させる電界制御手段とを備える生化学反応装置。
- [2] 2. 上記基板の上記電極は、上記反応領域の下層に形成された導電層であり、上記外部電極は、上記導電層と平行な平面を有することを特徴とする請求の範囲第1項記載の生化学反応装置。
- [3] 3. 上記電界制御手段は、上記電極と上記外部電極との間に交流電界を発生させることを特徴とする請求の範囲第1項記載の生化学反応装置。
- [4] 4. 上記電極は、探針状に形成されていることを特徴とする請求の範囲第1項記載の生化学反応装置。
- [5] 5. 上記電極は、アクセプタ又はドナーイオンがドーブされた半導体から構成されていることを特徴とする請求の範囲第1項記載の生化学反応装置。
- [6] 6. 生化学反応に用いられる基板である生化学反応用基板において、
上記生化学反応を行う反応領域と、
上記反応領域内に電界が形成されるように、外部電極との間に電界を発生させる電極と
を備えていることを特徴とする生化学反応用基板。
- [7] 7. 上記生化学反応は、ヌクレオチド鎖のハイブリダイゼーション反応であり、
上記反応領域は、上記ヌクレオチド鎖を固定可能な内部処理がされている表面層を有し、
上記電極は、上記表面層の下層に形成された導電層であることを特徴とする請求の範囲第6項記載の生化学反応用基板。
- [8] 8. 上記反応領域は、当該基板上に配設されたウェルであり、
上記表面層は、上記ウェルの底面に形成され、

上記導電層は、上記ウェル内において、上記外部電極との間の電界が、上記表面層に対して略垂直方向に形成されるように、上記ウェルの下層に形成されることを特徴とする請求の範囲第7項記載の生化学反应用基板。

- [9] 9. 上記導電層は、上記表面層に対向する位置に配置された電極との間に電界を形成させることを特徴とする請求の範囲第7項記載の生化学反应用基板。
- [10] 10. 当該基板は円板状であり、読み取り制御情報が記録されていることを特徴とする請求の範囲第6項記載の生化学反应用基板。
- [11] 11. 上記導電層は、光透過性を有することを特徴とする請求の範囲第7項記載の生化学反应用基板。
- [12] 12. 平板状の基板表面に対して、底面が第1の官能基で修飾された複数のウェルを形成し、
上記第1の官能基と結合する第2の官能基により一端が修飾されたヌクレオチド鎖を含む溶液を各上記ウェル内に滴下し、
平板状の基板に対して垂直方向の交流電界を印加しながら上記第1の官能基と第2の官能基とを結合させ、上記ヌクレオチド鎖を上記ウェルの底面に結合させることを特徴とするハイブリダイゼーション用の基板製造方法。
- [13] 13. 上記平板状の基板には、上記ウェルの下層に導電性材料からなる電極膜が形成されており、
上記基板表面に対して外部電極を近接させ、当該外部電極と上記電極膜との間に交流電力を加えることにより、上記平板状の基板に対して垂直方向に交流電界を印加することを特徴とする請求の範囲第12項記載のハイブリダイゼーション用基板の製造方法。
- [14] 14. 上記外部電極は、アクセプタ又はドナーイオンがドーピングされた半導体から構成されることを特徴とする請求の範囲第12項記載のハイブリダイゼーション用の基板製造方法。
- [15] 15. 平板状の基板の表面に形成されておりプローブ用のヌクレオチド鎖の一端が底面に結合されたウェルの内部に対して、サンプル用のヌクレオチド鎖を含む溶液を滴

下し、

上記平板状の基板に対して垂直方向に交流電界を印加し、上記プローブ用のヌクレオチド鎖と上記サンプル用のヌクレオチド鎖とをハイブリダイゼーションすることを特徴とするハイブリダイゼーション方法。

- [16] 16. 上記平板状の基板には、上記ウェルの下層に導電性材料からなる電極膜が形成されており、

上記基板表面に対して外部電極を近接させ、当該外部電極と上記電極膜との間に交流電力を加えることにより、上記平板状の基板に対して垂直方向に交流電界を印加する

ことを特徴とする請求の範囲第15項記載のハイブリダイゼーション方法。

- [17] 17. 上記外部電極は、アクセプタ又はドナーイオンがドーピングされた半導体から構成されることを特徴とする請求の範囲第15項記載のハイブリダイゼーション方法。

[図1]

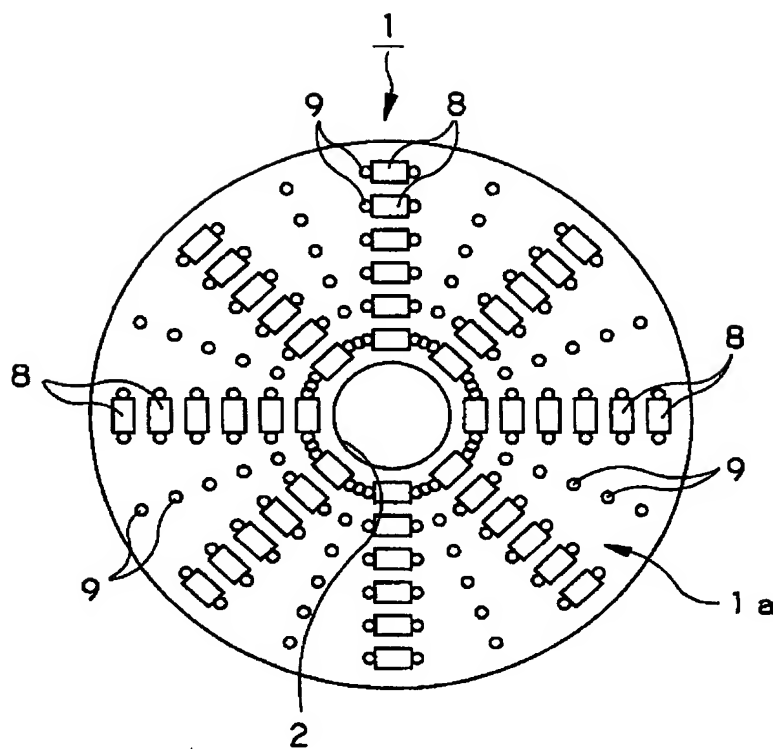


FIG. 1

[図2]

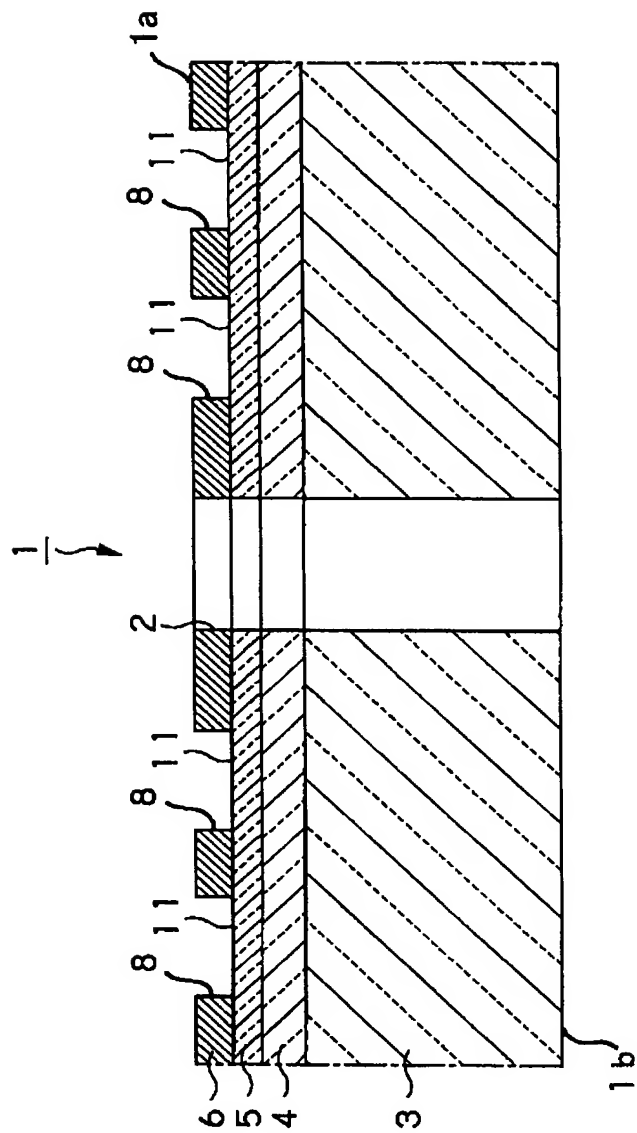


FIG. 2

[図3]

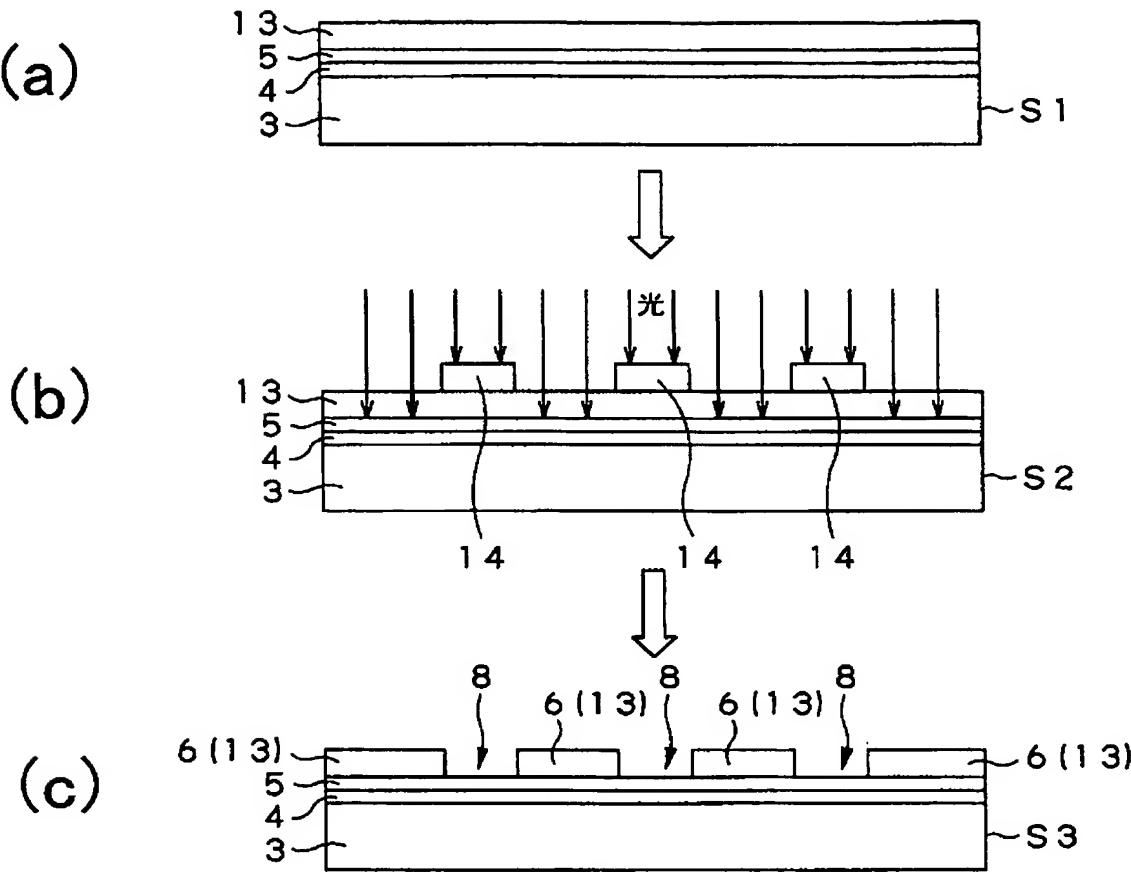


FIG.3

[図4]

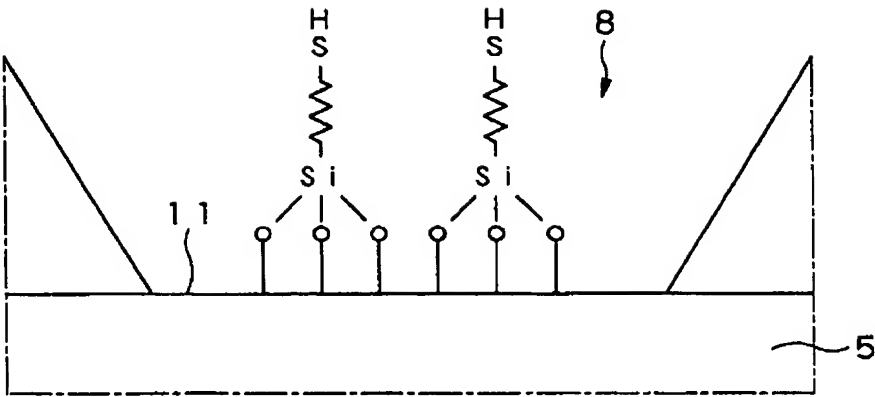


FIG.4

[図5]

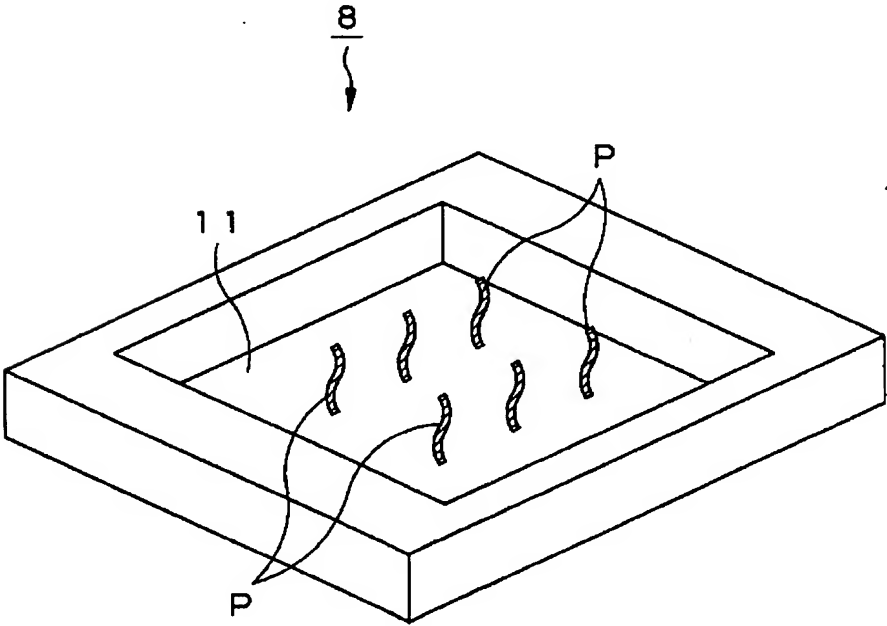


FIG.5

[図6]

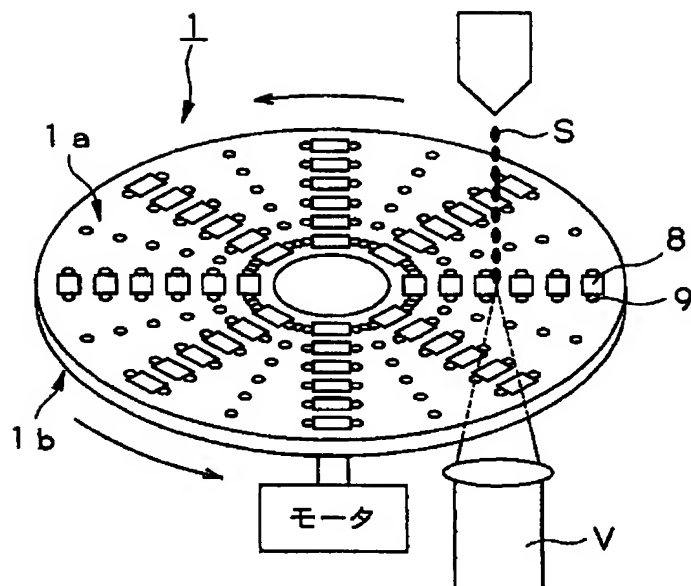


FIG. 6

[図7]

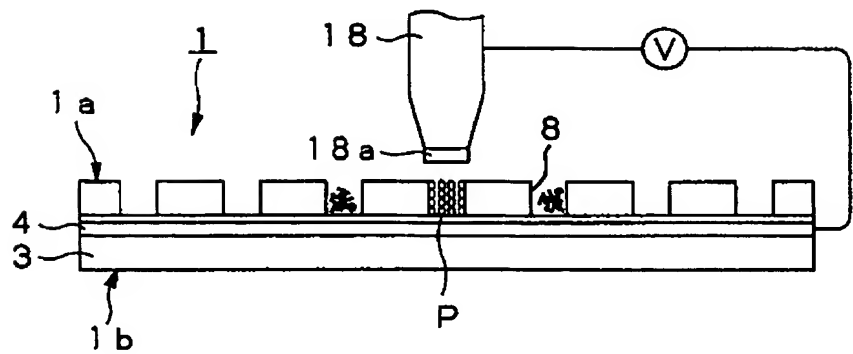


FIG. 7

[図8]

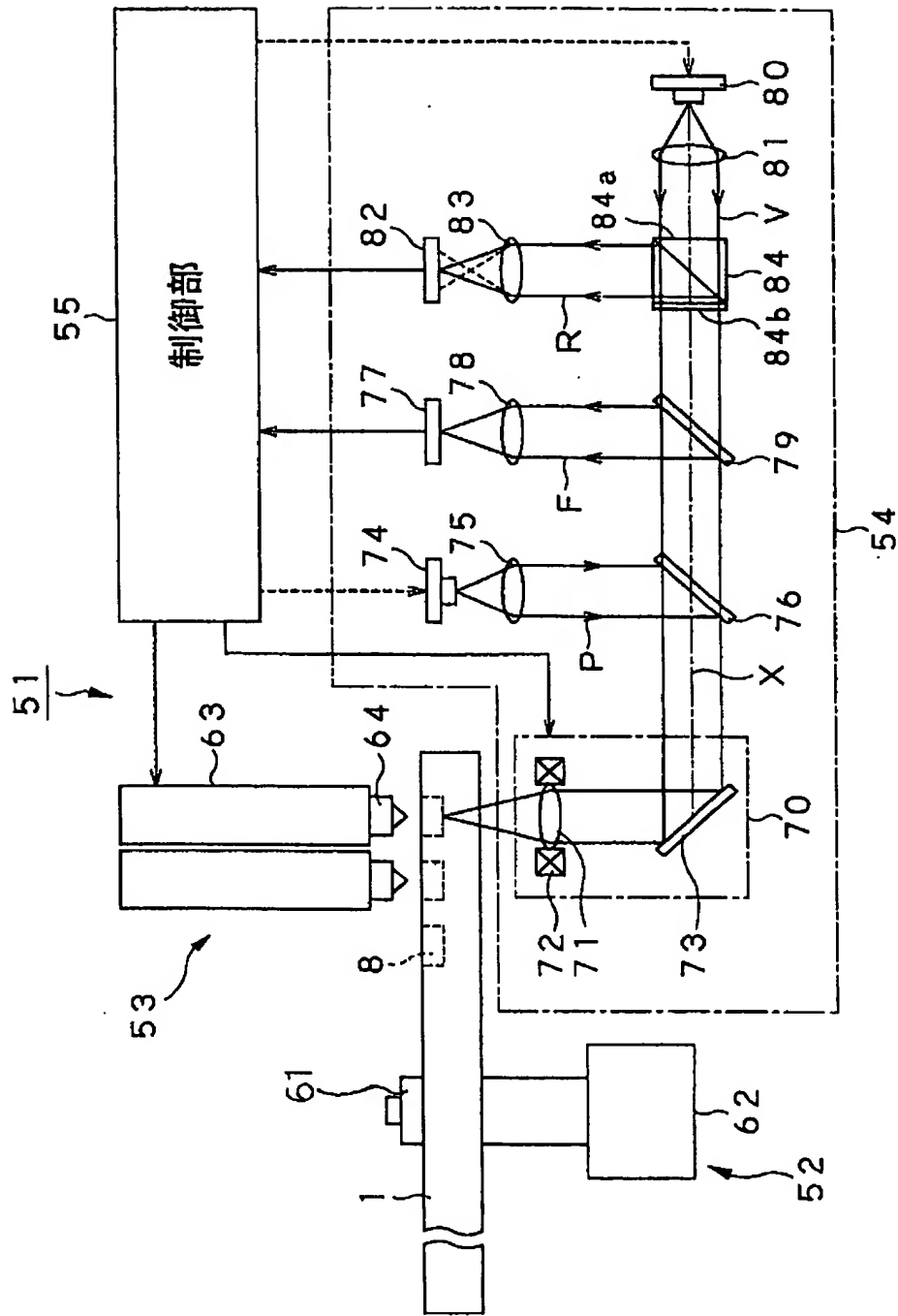


FIG.8

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2004/009544

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

Int.Cl⁷ G01N33/53, G01N37/00, C12M1/00, C12Q1/68

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

Int.Cl⁷ G01N33/53, G01N37/00, C12M1/00, C12Q1/68

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Jitsuyo Shinan Koho 1922-1996 Toroku Jitsuyo Shinan Koho 1994-2004

Kokai Jitsuyo Shinan Koho 1971-2004 Jitsuyo Shinan Toroku Koho 1996-2004

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X Y	JP 2003-149238 A (Yokogawa Electric Corp.), 21 May, 2003 (21.05.03), Claims; drawings & US 2003-087297 A	1-11, 15-17 1-17
X Y	JP 2001-330608 A (Toshiba Corp.), 30 November, 2001 (30.11.01), Claims; drawings & EP 1134294 A & US 2001-024788 A	1-14 1-17
A	JP 2003-185656 A (Fujitsu Ltd.), 03 July, 2003 (03.07.03), & US 2003-124717 A	1-17

☒ Further documents are listed in the continuation of Box C.☐ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search
04 August, 2004 (04.08.04)Date of mailing of the international search report
31 August, 2004 (31.08.04)Name and mailing address of the ISA/
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2004/009544

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
P,A	JP 2003-202343 A (Toray Industries, Inc.), 18 July, 2003 (18.07.03), (Family: none)	1-17
P,X	JP 2004-132720 A (Sony Corp.), 30 April, 2004 (30.04.04), & WO 2004/018663 A	1-17

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl.⁷ G01N33/53, G01N37/00, C12M1/00, C12Q1/68

B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl.⁷ G01N33/53, G01N37/00, C12M1/00, C12Q1/68

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

日本国実用新案公報	1922-1996年
日本国公開実用新案公報	1971-2004年
日本国登録実用新案公報	1994-2004年
日本国実用新案登録公報	1996-2004年

国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)

C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
X Y	JP 2003-149238 A(横河電機株式会社) 2003. 05. 21 特許請求の範囲、図面等参照 & US 2003-087297 A	1-11, 15-17 1-17
X Y	JP 2001-330608 A(株式会社東芝) 2001. 11. 30 特許請求の範囲、図面等参照 & EP 1134294 A & US 2001-024788 A	1-14 1-17

☒ C欄の続きにも文献が列挙されている。☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。

* 引用文献のカテゴリー

- 「A」 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの
- 「E」 国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの
- 「L」 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)
- 「O」 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献
- 「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献

- 「T」 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの
- 「X」 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの
- 「Y」 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの
- 「&」 同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

04. 08. 2004

国際調査報告の発送日

31. 8. 2004

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/JP)
郵便番号100-8915

東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官 (権限のある職員)

加々美 一恵

2 J

9 4 0 8

電話番号 03-3581-1101 内線 3251

C (続き) . 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
A	JP 2003-185656 A(富士通株式会社) 2003.07.03 & US 2003-124717 A	1-17
PA	JP 2003-202343 A(東レ株式会社) 2003.07.18 (ファミリーなし).	1-17
PX	JP 2004-132720 A(ソニー株式会社) 2004.04.30 & WO 2004/018663 A	1-17